

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

*Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И., Егоров С.К.  
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

**Введение** В ходе исследований бета-лактамазной активности поликлональных иммуноглобулинов нами был выявлен аномально высокий уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови больных и здоровых лиц [1]. В дальнейшем оказалось, что подобный феномен уже регистрировался группой исследователей компании Glaxo Research Ltd [2], а также научным

коллективом из Розарио, Аргентина [3]. Также было показано, что аналоги карбапенемов (в частности, 2-метилпенем-3-карбоксиловая кислота, или BCL-98) разрушаются альбуминами человеческой крови, причем данную активность опосредуют участки альбуминов, содержащие аминокислоты лизин и L-триптофан, глобулиновая фракция крови подобной активностью не обладает [4]. Тем не менее, описания вышеупомянутого явления содержат массу разночтений и противоречий.

**Цель.** Выявить природу бета-лактамазной активности сыворотки крови.

**Материалы и методы** Для оценки бета-лактамазной активности сыворотки крови использовали модифицированную нами нитроцефиновую методику [5]. Исследуемая сыворотка крови была получена путем пулирования сывороток крови 80 практически здоровых военнослужащих.

В качестве тест-объекта использовали также человеческий сывороточный альбумин, полученный на Витебской областной станции переливания крови методом спиртовой седиментации по Кону, и лиофилизированный человеческий сывороточный альбумин производства Reanal, Венгрия.

Выделение поликлональных IgG производилось из сыворотки крови 51 больного при помощи аффинной хроматографии на протеине A *S. aureus*. Для тонкого фракционирования крови использовали диск-электрофорез сыворотки крови в 7,5% полиакриламидном геле с последующим разрезанием трубок геля на отрезки длиной 0,5 см и изолированным определением уровня распада нитроцефина в каждом отрезке.

С целью изучения особенностей выявленной бета-лактамазной активности сыворотка крови обрабатывалась растворами квалуанага калия, тазобактама, лаурилсульфата натрия, мочевины, ЭДТА, фуросемида, ацетилсалициловой кислоты (все - химически чистые субстанции производства Sigma).

Изменения белков сыворотки крови под воздействием вышеперечисленных реагентов регистрировались при помощи плоскостного электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле (окраска Кумасси R250 и серебром). В качестве маркера молекулярного веса белков использовали Sigma Marker Wide Range (M.W. 6 500-205.000). Анализ аминокислотной последовательности альбумина и сравнение ее с таковой бета-лактамаз производились при помощи программы CLC Main Workbench 5.6, а построение денситограмм результатов электрофореза - при помощи программы TotalLab TL120.

**Результаты и обсуждение** Как оказалось, бета-лактамазная активность сыворотки крови обусловлена практически исключительно альбуминами с молекулярной массой 64-69 кДа. Поликлональные IgG также обладают бета-лактамазной активностью, но она составляет не более 1,04% от общей сывороточной.

Очищенный человеческий сывороточный альбумин, полученный из различных источников, также обладает высокой бета-лактамазной активностью. Анализ зависимости бета-лактамазной активности альбумина от pH показал, что оптимум pH для данной реакции лежит около 9,0, что соответствует «дикой» разновидности пенициллиназы tem-1 [6].

Обработка сыворотки крови лаурилсульфатом натрия привела к полному подавлению ее бета-лактамазной активности, при этом на электрофореграммах были отчетливо видны признаки денатурации сывороточных белков.

Обработка сыворотки крови более мягким детергентом (мочевойной) и универсальным хелатором (ЭДТА) не привела к значимому снижению ее бета-лактамазной активности, причем электрофорграммы подтвердили сохранность структуры сывороточных белков

Показано также, что клавуланат калия в концентрации 5 мг/мл снижает бета-лактамазную активность сыворотки крови на 32,48%, а тазобактам в той же концентрации - на 16,34%. Сравнение аминокислотной последовательности участков связывания клавулановой кислоты и тазобактама бактериального пенициллиназы shv-1 и человеческого сывороточного альбумина (классического варианта из 609 аминокислот) показало идентичность участка KQR1.K (лизин-глутамин-аргинин-лейцин-лизин); в молекуле альбумина данный участок располагается в позиции с 219 по 223 аминокислоты (что соответствует домену 2A).

Структура участка связывания тазобактама отличается от вышеприведенной двумя аминокислотами в крайних позициях - SQRLS (серин-глутамин-аргинин-лейцин-серин), что легко объясняет менее эффективное ингибирование бета-лактамазной активности сыворотки крови тазобактамом по сравнению с клавуланатом калия. Известно, что фуросемид связывается с доменом 2A молекулы альбумина в положениях K199, R218, L219, R222, F223, L238, V241, D256, R257, L260, A261, I264, S287, I290, A291, V293, т.е. блокирует и часть интересующих нас аминокислот (в положениях 219, 222, 223) [7]

Действительно, добавление раствора фуросемида к сыворотке крови приводит к снижению ее бета-лактамазной активности на 37,1%. В свою очередь, добавление ацетилсалициловой кислоты вызывает ацетилирование лизина в позиции 223, что снижает бета-лактамазную активность сыворотки крови на 20,1%.

**Выводы.** Бета-лактамазная активность сыворотки крови практически полностью обусловлена альбуминами: указанная активность имеет оптимум pH>9,0, практически не зависит от кофакторов, проявляется только при сохраненных третичной и четвертичной структурах альбумина. Данная активность связана с наличием в сайте 2A молекулы альбумина пространственной структуры (KQR1.K, позиции 219-223), напоминающей активный центр бактериальных пенициллиназ. Ввиду чего бета-лактамазная активность сыворотки крови эффективно ингибируется клавулановой кислотой и менее эффективно - тазобактамом.

Литература:

1. Жильцов, И.В. Необычно высокий уровень распада антибиотиков бета-лактаманной группы в человеческой плазме и сыворотке крови / Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И. // Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням - Витебск, 2008. - Том 1. - с 85-86
2. O'Callaghan, H.C. Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate // H.C. Callaghan, A. Morris, S.M. Kirby, A.H. Shingler // Antimicrobial agents and chemotherapy. - 1972. - Vol. 1, №4. - P. 283-288
3. Nerli, B. An unknown hydrolase activity of human serum albumin, beta-lactamase activity / B. erli, F.Garcia, G. Pico // Biochem Mol Biol Int. - 1995. - Nov., 37 (5): P 909-915.
4. Bruderlein, H. An investigation of the destruction of the beta-lactam ring of penems by the albumin drug-binding site / H. Bruderlein, R. Daniel, D. Perras et al. // Can J Biochem. - 1981. - Vol 59 (10) - P. 857-866
5. Веремей, И.С. Подходы к определению бета-лактамазной реактивности макроорганизма: способы выполнения и их сравнительная характеристика / И.С. Веремей, И.В. Жильцов, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Иммунопатол.,

аллергол , инфектол. – 2008 – №3. – с.49-54.

6. Golemi-Kotra, D. The Importance of a Critical Protonation State and the Fate of the Catalytic Steps in Class A-Lactamases and Penicillin-binding Proteins / D. Golemi-Kotra, S.O. Meroueh, C. Kim at al. // The journal of biological chemistry. - 2004 - Vol. 279, №33, Issue of August 13. - P.34665- 34673.

7. International Patent WO 2005/041895 A2, 12 May, 2005. - P 16-22.